

BEST AVAILABLE COPY

10/506548

01731 03/02000

日本国特許庁

28.03.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月 4日

出願番号

Application Number:

特願2002-057527

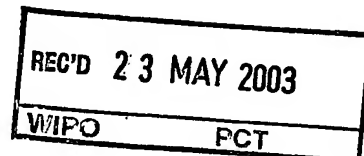
[ST.10/C]:

[JP2002-057527]

出願人

Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所
生化学工業株式会社



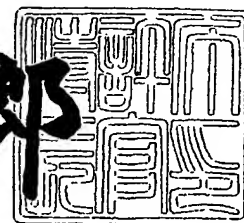
Best Available Copy

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033256

【書類名】 特許願

【整理番号】 J200200400

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00
C12N 9/10

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 成松 久

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 杉岡 しげみ

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国立市中 1-10-23 ファミール国立 201

【氏名】 望月 秀雄

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100120606

【弁理士】

【氏名又は名称】 五丁 龍志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 062307

【納付金額】 10,500円

【その他】

国等以外のすべての者の持分の割合 50/100

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成13年度新
エネルギー・産業技術総合開発機構 糖鎖合成関連遺伝
子ライブラリーの構築委託研究、産業活力再生特別措置
法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0118594

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【整理番号】 J200200400

【発明の名称】 硫酸基転移酵素、そのポリペプチド及びそれをコードする DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号 2 記載のアミノ酸配列に 1 又は複数のアミノ酸による置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を有するとともに硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素のポリペプチド。

【請求項 2】 ポリペプチドが配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 3 7～3 4 6 からなるペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 4】 グリコサミノグリカンがヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 5】 請求項 1 乃至 4 いずれか一項記載のポリペプチドを含むとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素。

【請求項 6】 請求項 1 乃至 4 いずれか一項記載のポリペプチド若しくは請求項 5 記載の硫酸基転移酵素をコードする核酸。

【請求項 7】 配列番号 1 記載の塩基配列からなることを特徴とする核酸。

【請求項 8】 請求項 6 又は 7 記載の核酸又はその塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることを特徴とする核酸。

【請求項 9】 請求項 6 乃至 8 いずれか一項記載の核酸を含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 10】 請求項 9 記載の発現ベクターを含むことを特徴とする組換え体

【請求項 1 1】 真核細胞である宿主細胞に対して請求項 9 記載の発現ベクターを導入してなることを特徴とする組換体。

【請求項 1 2】 請求項 1 0 又は 1 1 記載の組換体を培養し、得られた培養物から請求項 1 乃至 4 いずれか一項記載のポリペプチド又は請求項 5 記載の硫酸基転移酵素を分離することを特徴とするポリペプチド又は硫酸基転移酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素（グリコサミノグリカンスルホトランスフェラーゼ）、そのポリペプチド及びそれをコードする塩基配列を有する核酸に関するものである。より詳しくは硫酸基受容体であるヘパリン又はヘパラン硫酸に対して硫酸基供与体から硫酸基を転移する活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含む酵素、該ポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸、前記核酸を含むベクター、組換体、及び該組換体から前記ポリペプチドを製造する方法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ヘパラン硫酸は、ヘキサロン酸（HexA）残基（D-グルクロン酸（以下単に「グルクロン酸」又は「GlcA」とも記載する）残基又はL-イズロン酸（以下単に「イズロン酸」又は「IdoA」とも記載する）残基）とN-アセチルグルコサミン（以下単に「GlcNAc」とも記載する）残基の二糖（ $4\text{GlcA}\beta 1/\text{IdoA}\alpha 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\alpha 1$ ）の繰り返し構造を基本骨格とし、そのHexA残基の2位ヒドロキシル基及びGlcNAc残基の2位アセチルアミノ基、3位ヒドロキシル基、及び6位ヒドロキシル基の一部のそれぞれが硫酸化されたグリコサミノグリカンの一種である。

【0 0 0 3】

グリコサミノグリカン硫酸基転移酵素の遺伝子がクローニングされ、該酵素を大量に得ることにより、硫酸基受容体となるグリコサミノグリカンに対する該酵素の基質特異性についての情報を得ることが可能となり、グリコサミノグリカン

の構造と機能の関係を研究する上で有用なアプローチが提供され则认为られる。グリコサミノグリカンの生合成、その中でもヘパリン／ヘパラン硫酸の生合成には多くの硫酸化のプロセスがあることが知られており（木幡陽、箱守仙一郎、永井克孝編、グリコテクノロジー⑤、57(1994)、講談社サイエンティフィック発行）、この硫酸化には様々なグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素が関与しているものと考えられる。ヘパリン／ヘパラン硫酸に硫酸基を転移するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素としては、ヘパラン硫酸N-脱アセチル／N-硫酸基転移酵素（以下「NDST」と略記することもある）、ヘパラン硫酸2-O-硫酸基転移酵素（以下「HS2ST」と略記することもある）、ヘパラン硫酸3-O-硫酸基転移酵素（以下「HS3OST」と略記することもある）及びヘパラン硫酸6-O-硫酸基転移酵素（以下「HS6ST」と略記することもある）等が種々の生物、特にヒトから単離されており、それらのcDNAのクローニングがされている。

【0004】

ヒトのHS3OSTのcDNAは、J. Biol. Chem. 272(44), 28008-28019(1997)において開示されており、当該文献に記載されているcDNAはGenbankに受け入れ番号AF019386として登録されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

ヘパリンやヘパラン硫酸の骨格（以下「ヘパリン骨格」とも記載する）に硫酸基を転移することができる酵素は、ヘパリンやヘパラン硫酸の化学合成に使用することができる可能性が高く極めて有用であるが、そのような酵素は基質特異性が高く、工業的に様々な種類のヘパリンやヘパラン硫酸を合成するためには様々な種類の酵素を使用して効率的に合成を行う必要がある。しかし、ヘパリン骨格に硫酸基を転移する酵素のバリエーションは、まだ十分であるとはいえない。すなわち、本発明は新規な硫酸基転移酵素を提供するとともに、そのポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAをクローニングすることにより、当該酵素を簡便な方法により大量に入手する手段を提供し、それにより酵素化学的に合成することができる多糖のバリエーションを増すと共に、ヘパリン骨格を有する多糖の構造－機能の関係の解明に寄与することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヘパラン硫酸を硫酸化するグリコサミノグリカン硫酸基転移酵素をコードする塩基配列を有するDNAを鋭意検索し、該酵素のポリペプチドをコードする塩基配列を有する新規なDNAを発見し、該DNAによりヘパラン硫酸硫酸基転移酵素が発現することを確認して本発明を完成させた。

【0007】

すなわち本発明は以下の通りである。

【特許請求の範囲】

(1) 配列番号2記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号2記載のアミノ酸配列に1又は複数のアミノ酸による置換、欠失、挿入若しくは転移を有するアミノ酸配列を有するとともに硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素のポリペプチド。

(2) ポリペプチドが配列番号2記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする(1)記載のポリペプチド。

(3) 配列番号2記載のアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号37～346からなるペプチドであることを特徴とする(1)記載のポリペプチド。

(4) グリコサミノグリカンがヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする(1)乃至(3)いずれか記載のポリペプチド。

(5) (1)乃至(4)いずれか記載のポリペプチドを含むとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素。

(6) (1)乃至(4)いずれか記載のポリペプチド若しくは(5)記載の硫酸基転移酵素をコードする核酸。

(7) 配列番号1記載の塩基配列からなることを特徴とする核酸。

(8) (6)又は(7)記載の核酸又はその塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることを特徴とする核酸。

(9) (6) 乃至 (8) いずれか記載の核酸を含むことを特徴とする発現ベクター。

(10) (9) 記載の発現ベクターを含むことを特徴とする組換え体。

(11) 真核細胞である宿主細胞に対して (9) 記載の発現ベクターを導入してなることを特徴とする組換え体。

(12) (10) 又は (11) 記載の組換え体を培養し、得られた培養物から (1) 乃至 (4) いずれか記載のポリペプチド又は (5) 記載の硫酸基転移酵素を分離することを特徴とするポリペプチド又は硫酸基転移酵素の製造方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

(1) 本発明酵素

本発明酵素は配列番号2記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドを有するとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素である。

【0009】

本発明酵素におけるポリペプチドはたとえば配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド又は配列番号2記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドがあげられる。このようなポリペプチドは特にほ乳類由来であることが好ましく、特にヒト由来であることが好ましい。本発明ポリペプチドは、特に配列番号2記載のアミノ酸配列のうち予測される膜貫通領域（配列番号2記載のアミノ酸番号1～36からなる領域）を除いたアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列からなるポリペプチドがいわゆる可溶化形態となりタンパク質の調製が容易となるため好ましい。

【0010】

一般に、酵素タンパク質のアミノ酸配列のうち、1又は複数（通常は2以上34以下）の構成アミノ酸が置換、欠失、挿入、或いは転位しても酵素活性が維持されることが知られ、同一酵素のバリエーションであるということが出来るが、本発明

物質においても配列番号2記載のアミノ酸配列に1又は複数(2以上34以下)の構成アミノ酸の置換、欠失、挿入、或いは転位等の部分的な変異が起こっていても後述の硫酸基を転移する活性を保持している限りにおいて、本発明酵素と実質的に同一の物質であるといえることができる(このような配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに部分的な変異を有するポリペプチドを便宜的に「修飾ポリペプチド」と記載する)。このような修飾ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、さらに97%以上の相同性を有することを好ましい。アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピュータソフトウェアを用いて容易に算出することができ、このようなソフトウェアはインターネットによっても利用に供されている。

【0011】

尚、上記本発明酵素は、そのアミノ酸配列が上記した通りのものであり、上記した酵素活性を有するものであればタンパク質に糖鎖が結合していても良い。すなわち本発明酵素には糖タンパク質の形態も当然に包含する。

【0012】

本発明酵素における硫酸基供与体としては、硫酸基受容体に対して硫酸基を転移することが可能な物質であれば特に限定はされないが、一般的に生体内で硫酸基供与体として働いていることが知られている3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸(活性硫酸:以下「PAPS」とも略記する)が本発明酵素が本来生体内で作用する酵素であることから酵素本来の硫酸基供与体である可能性が高いため好ましい。

【0013】

グリコサミノグリカンとは、たとえばヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンなどが例示されるが、特に本発明酵素の硫酸基受容体としては、ヘパラン硫酸及びヘパリンなどのいわゆるヘパリン骨格を有するグリコサミノグリカンが好ましく、特にヘパラン硫酸が好ましい。尚、本発明酵素は後述の実施例からも明かであるが、サメ軟骨由来のコンドロイチン硫酸、牛気管由来のコンドロイチン硫酸を脱硫酸化して得たコンドロイチン、ブタ皮由来のデルマトン硫酸、及びニワトリ鶏冠由

来のデルマタン硫酸から硫酸基を除去した脱硫酸化デルマタン硫酸には硫酸基を転移する活性を実質的に有しない。

【 0 0 1 4 】

このような本発明酵素の硫酸基転移活性はたとえば、放射能 (^{35}S 、 ^3H (トリウム) 等) や蛍光物質 (基質に立体障害などを起こさないことから放射能が好ましい) 等の標識物質で標識したPAPSを用いてグリコサミノグリカンに硫酸基受容体として使用して緩衝液中で20~40℃条件下で酵素反応を行い、受容体が標識物質で標識されるか否かを、たとえば反応後の反応溶液をゲル濾過又は高速液体クロマトグラフィー (以下「HPLC」とも略記する) などの分離手段と、標識物質を検出する手段 (標識物質として放射能を用いる場合にはシンチレーションカウンタ又はオートラジオグラフィーなどの放射能検出手段、標識物質として蛍光物質を用いる場合には蛍光検出器による検出) とを組み合わせることで、容易に確認することが可能である。

【 0 0 1 5 】

このようにして得られた本発明酵素は、グリコサミノグリカン、特にヘパリン及びヘパラン硫酸に特異的に硫酸基を転移する活性を有しているため、糖鎖修飾剤として使用することが可能である。このような糖鎖修飾剤は、例えばpH6.5~8.0の緩衝液中で硫酸基供与体及び硫酸基受容体 (糖鎖) 共存下で、硫酸基供与体から硫酸基を硫酸基受容体に転移して糖鎖を修飾することができる。このような糖鎖の修飾は、タンパク質保護剤 (例えばプロタミン塩酸塩) の共存下で行うことが、本発明酵素の安定性を確保して糖鎖の十分な修飾が可能となることから好ましい。

【 0 0 1 6 】

(2) 本発明ポリペプチド

本発明ポリペプチドは、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有するポリペプチドである。

【 0 0 1 7 】

本発明ポリペプチドのアミノ酸配列としては、たとえば配列番号2記載のアミノ酸配列、または配列番号2記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号37~346記

載のアミノ酸配列が例示される。尚、前者又は後者のアミノ酸配列に1又は複数(2以上34以下)の構成アミノ酸の置換、欠失、挿入、或いは転位等の部分的な変異が起こっていても変異後のポリペプチドが硫酸基を転移する活性を保持している限りにおいて、本発明ポリペプチドと実質的に同一の物質であるといえることができる。90%以上、好ましくは95%以上、さらに97%以上の相同性を有することを好ましい。アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピュータソフトウェアを用いて容易に算出することができ、このようなソフトウェアはインターネットによっても利用に供されている。

【0018】

本発明ポリペプチドにおける硫酸基供与体及びグリコサミノグリカン、上記本発明酵素で記載したものと同一であり(ヘパラン硫酸及びヘパリンが好ましく、ヘパラン硫酸がもっとも好ましい)、また硫酸基を転移する活性も上記本発明酵素で記載した方法と同様の測定方法が例示される。

【0019】

このような本発明ポリペプチドは、糖鎖が結合していない態様の本発明酵素(すなわち、本発明酵素のポリペプチド)と実質的に同一と言うことが可能である。

【0020】

また、本発明ポリペプチドは、本発明酵素と同様にグリコサミノグリカン、特にヘパラン硫酸及びヘパリンに特異的に硫酸基を転移する活性を有しているため、糖鎖修飾剤として使用することが可能である。

【0021】

(3) 本発明核酸、本発明発現ベクター、及び本発明組換え体

本発明核酸は、本発明酵素又は本発明ポリペプチドをコードする核酸である。

【0022】

本発明核酸は、本発明酵素のポリペプチド又は本発明ポリペプチドをコードする限りにおいて、デオキシリボ核酸(DNA)ともリボ核酸(RNA)とも限定はされず、また1本鎖であろうと2本鎖であろうと限定はされない。しかし、上記本発明酵素及び本発明ポリペプチドがヒト由来のアミノ酸配列であるため、ヒトをは

じめとする多くの生物においてタンパク質をコードする働きを有しているDNAであることが好ましい。

【0023】

本発明における「コードする核酸」とは、一般的にはタンパク質合成における転写の際に、mRNA合成の鋳型となる鋳型鎖の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸、及びmRNA合成の鋳型となる鋳型鎖の塩基配列からなる核酸のいずれも指称する。

【0024】

このような核酸の塩基配列としては例えば配列番号1記載の塩基配列若しくは配列番号1記載の塩基配列中、塩基番号109～1041からなる塩基配列（アミノ酸番号37～346のコード領域に対応している塩基配列）、又はこれらの塩基配列に相補的な塩基配列を示し、このような塩基配列からなる核酸は本発明核酸に包含される。

【0025】

さらに、核酸は一定条件下でそれに相補的な塩基配列を有する核酸とハイブリダイズすることが知られているが、本発明核酸においても配列番号1記載の塩基配列若しくは配列番号1記載の塩基配列中、塩基番号109～1041からなる塩基配列、又はこれらの塩基配列に相補的な塩基配列からなるヌクレオチド鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸も包含される。

【0026】

ここでストリンジェントな条件下とは、50%ホルムアミド、5×SSPE（塩化ナトリウム／リン酸ナトリウム／EDTA（エチレンジアミン四酢酸）緩衝液）、5×デンハルト溶液（Denhardt's solution）、0.5% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、変性サケ精子DNA100 μ g/ml存在下、42℃の条件下及びこれと実質的に同一の条件下などが例示される。すなわちストリンジェントな条件とは、通常の遺伝子のハイブリダイゼーションに用いられる条件であり、ノザンプロット、サザンプロット、ハイブリダイゼーションを用いたスクリーニング等に使用される条件であれば、ここにいう「ストリンジェントな条件下」に包含される。

【0027】

本発明核酸の好ましい形態の一つである、配列番号 1 記載の塩基配列中、塩基番号 1 0 9 ~ 1 0 4 1 からなる塩基配列からなる DNA は、後述の実施例に記載された方法によって調製することも可能であり、また本発明によりその塩基配列のすべてが明らかとされたため、例えばヒト由来の cDNA ライブラリーを鋳型として用いて 5' プライマー（配列番号 3）及び 3' プライマー（配列番号 4）を用いて常法によりポリメラーゼチェーン反応（以下「PCR」とも略記する）を行うことで調製することができる。また同様に 5' プライマーとして配列番号 5 記載のプライマーを用い、3' プライマーとして配列番号 4 記載のプライマーを用いて PCR を行うことで、配列番号 1 記載の塩基配列からなる DNA を調製することも可能である。

【 0 0 2 8 】

本発明発現ベクターは上述の本発明核酸を含むことを特徴としており、通常は DNA である本発明核酸から宿主細胞中で本発明酵素又は本発明ポリペプチドを発現しうるように構築されている。

【 0 0 2 9 】

上記本発明発現ベクターとして利用する基本ベクターは当業者であれば培養に使用する宿主細胞に合わせて適宜選択することができ、選択した基本ベクターに常法により上記本発明核酸を連結して本発明発現ベクターを構築することができる。

【 0 0 3 0 】

また、本発明発現ベクターから本発明酵素や本発明ポリペプチドを発現させて得る際に、その単離、精製が容易となるように本発明酵素や本発明ポリペプチドを識別ペプチドとの融合タンパク質として発現しうるように構築されていてもよい。識別ペプチドは、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質の N 末端に存在し、タンパク質の選別のために細胞内では機能している 15 ~ 30 アミノ酸残基からなるペプチド：例えば OmpA、OmpT、Dsb 等）、プロテインキナーゼ A、プロテイン A（黄色ブドウ球菌細胞壁の構成成分で分子量約 42,000 のタンパク質）、グルタチオン S 転移酵素、His タグ（ヒスチジン残基を 6 ~ 10 個並べて配した配列）、myc タグ（cMyc タンパク質由来の 13 アミノ酸配列）、FLAG ペプチド（8 アミノ酸配

列からなる分析用マーカー)、T7タグ (gene10タンパク質の最初の11アミノ酸配列)、Sタグ (脾臓RNaseA由来の15アミノ酸配列)、HSVタグ、pelB (大腸菌外膜タンパク質pelBの22アミノ酸配列)、HAタグ (ヘマグルチニン由来の10アミノ酸配列)、Trxタグ (チオレドキシン配列)、CBPタグ (カルモジュリン結合ペプチド)、CBDタグ (セルロース結合ドメイン)、CBRタグ (コラーゲン結合ドメイン)、 β -lac/blu (β ラクタマーゼ)、 β -gal (β ガラクトシダーゼ)、luc (ルシフェラーゼ)、HP-Thio (His-patchチオレドキシン)、HSP (熱ショックペプチド)、Ln γ (ラミニン γ ペプチド)、Fn (フィブロネクチン部分ペプチド)、GFP (緑色蛍光ペプチド)、YFP (黄色蛍光ペプチド)、CFP (シアン蛍光ペプチド)、BFP (青色蛍光ペプチド)、DsRed、DsRed2 (赤色蛍光ペプチド)、MBP (マルトース結合ペプチド)、LacZ (ラクトースオペレーター)、IgG (免疫グロブリンG)、アビジン、プロテインGからなる群から選択されるいずれかのペプチドを指称し、何れの識別ペプチドであっても使用することが可能である。その中でも特にシグナルペプチド、プロテインキナーゼA、プロテインA、グルタチオンS転移酵素、Hisタグ、mycタグ、FLAGペプチド、T7タグ、Sタグ、HSVタグ、pelB又はHAタグが、遺伝子工学的手法による本発明酵素及び本発明ポリペプチドの発現、精製がより容易となることから好ましい。

【0031】

上記宿主細胞としては原核細胞 (例えば大腸菌など) であっても真核細胞 (例えば酵母、昆虫細胞、ほ乳類細胞など) であっても使用することは可能である。特に原核細胞を宿主細胞として使用した場合には、本発明核酸が発現すると糖鎖の付加などがなされないため、本発明ポリペプチドを得ることができる。しかし、本発明酵素は真核生物において通常には発現している酵素であるため、宿主細胞としては真核細胞が好ましく、好適には昆虫細胞 (本発明酵素又は本発明ポリペプチドの大量合成の面で優れる) 又はほ乳類細胞 (本発明酵素本来の発現がなされている細胞である面で優れる) が例示される。

【0032】

本発明組換え体は、このような宿主細胞に、それに適合した基本ベクターを使用して構築した本発明ベクターを常法により導入した細胞である。

【0033】

(4) 本発明製造方法

本発明製造方法は、本発明組換え体を培養し、得られた培養物から本発明ポリペプチド又は本発明酵素を分離することを特徴とする本発明ポリペプチド又は本発明酵素の製造方法である。

【0034】

本発明組換え体の培養は、組換え体に用いた宿主細胞に適した方法を当業者であれば適宜選択して行うことができる。ここで培養とは、組換え体を生体外の例えば培養装置又は培養器具などを用いて行う育成の他に、宿主細胞を生体に投与し、その生体内で増殖させる育成も含む概念である。

【0035】

本発明製造方法における培養物とは、培養に用いた培地、培養された組換え体そのものの他、生体内で組換え体を育成させた際に得られる生体の排泄物、分泌物、体液、組織なども含まれる。

【0036】

培養物からの本発明ポリペプチドの分離は例えばゲル濾過やHPLCなどの分子量による分離手段、本発明ポリペプチドの示す酵素活性において硫酸基供与体（PA、PSなど）を固相化したアフィニティーカラムなどの分離手段の他、本発明ベクターが識別ペプチドとともに本発明ポリペプチドを融合タンパク質として発現するように構築してある場合においては、識別ペプチドを特異的に吸着する手段により本発明ポリペプチドを分離することが可能である。例えば識別ペプチドとしてFLAGペプチドを用いた場合には、抗FLAG抗体を固相化したアフィニティーカラムを用いることで、比較的容易に本発明ポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として得ることが可能である。

【0037】

【実施例】

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

1. 遺伝子データベースの検索とSFT-1遺伝子の塩基配列決定

既知のヒト由来のヘパラン硫酸3-O-スルホトランスフェラーゼ（HS30ST）遺伝

子を用いて、遺伝子データベースから類似遺伝子の検索をおこなった。用いた配列はHS30ST遺伝子の配列番号：AF019386である。また、検索は、Blast [Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 402-410(1990)] を用いた。

【0038】

その結果、ゲノム配列GeneBank Accession No.AL355498の中に類似した配列が見いだされ、HS30ST遺伝子に相同性を有する新規遺伝子が同定された。遺伝子解析プログラム (GENSCAN: Stanford University製) によってこの新規遺伝子は2つのエクソンによってコードされていることが予測された。

【0039】

(1) 本発明ポリペプチドのコード領域の確認

Human Kidney Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社製) を用い、付属のAP1プライマーと (cDNA断片の両側にAP1、AP2のアダプターがついている)、第2エクソンの5'末端付近の配列部分に設定したプライマー (GP-226: 配列番号6) でPCR (94℃5秒、68℃4分を35サイクル) をおこなった。さらにMarathon cDNA付属のAP2プライマーと配列部分に設定したプライマー (GP-224: 配列番号7) でnested PCR (94℃5秒、68℃4分を40サイクル) をおこなった。その結果得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動に供し、約450bのバンドをGel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて回収した。得られたDNA断片の塩基配列を常法により解析した結果、第1エクソンの配列 (N-末端の36アミノ酸がコードされていた) に続き第2エクソンの配列が確認された。これは遺伝子解析プログラムによって予測されたものと同じであった。従って、本発明ポリペプチドのコード領域は第1エクソンと第2エクソンを結合した配列番号1に示す配列であることが確認された。

【0040】

(2) 第2エクソンのクローニング

上記の結果から第1エクソンにコードされているのはN-末端の36アミノ酸だけである。第2エクソンが本発明ポリペプチドの大部分をコードしており、活性領域を含む酵素の主要部分は第2エクソン中に含まれていることが予測された (第2エクソンにコードされた本発明ポリペプチドを便宜的にSFT-1と記載する)。そこで遺伝子DNAを鋳型として第2エクソン部分のクローニングをおこなった。

【0041】

Human Genomic DNA (CLONTECH社製) を鋳型として第2エクソンを含む領域のPCR (94℃15秒、50℃30秒、68℃1分を35サイクル) をおこなった。使用したプライマーは第2エクソンの上流部分 (SFTex2F: 配列番号8) と停止コドンの下流部分 (SFTex2R: 配列番号9) のゲノム配列に設定した。得られた約1kbの断片を常法により精製し、塩基配列を解析した結果、第2エクソンの配列を得られていることが確認された。

【0042】

2. SFT-1遺伝子の発現ベクターへの組込み

遺伝子の発現系を作成するため、まず上記で得られた第2エクソンのDNAをインビトロジェン社製のGatewayシステムの発現ベクターpDONR201に組込み、さらにインビトロジェン社製のBac-to-BacシステムによるBacmidを作成した。以下詳細に説明する。

【0043】

(1) 新規硫酸基転移酵素のエントリークロンの作製

上記で第2エクソンを増幅して得られたPCR産物を鋳型として、再度PCR (94℃15秒、68℃3分を30サイクル) をおこないGatewayシステム用のDNA断片を得た。使用したプライマーは第2エクソンの5'末端近くの配列と停止コドン付近の配列にGatewayシステム用の配列を付加した5'プライマー (SFTgateF2: 配列番号10) および3'プライマー (SFTgateRstop: 配列番号11) である。常法により精製したDNA断片を用い、BPクローナーゼ反応によってpDONR201へ組み込み、エントリークロンを作成した。反応は目的とするDNA断片1 μ l、pDONR201を1 μ l (150ng)、反応緩衝液2 μ l、トリス-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)緩衝液 (以下「TE」とも略記する) 4 μ l、BPクローナーゼミックス2 μ lを25℃で1時間インキュベートして行った。プロテイナーゼKを1 μ l加えて37℃で10分保って反応を停止させた。

【0044】

その後上記反応液5 μ lをコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 100 μ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含むLBプレートにまいた

。翌日コロニーをとり、カナマイシンを含むLB培地3mlで培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製) によりプラスミドを抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とするDNAが組み込まれていることを確認した。

【 0 0 4 5 】

(2) 発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側にλファージが大腸菌から切り出される際の組換部位であるattLを持つもので、LRクロナーゼ(λファージの組換酵素Int、IHF、Xisを混合したもの)とデステイネーションベクターとを混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下の通りである。

【 0 0 4 6 】

まずエントリークローン1μl、pFBIFを0.5μl (75ng)、LR反応緩衝液2μl、TE 4.5μl、LRクロナーゼミックス2μlを25℃で1時間反応させ、プロテイナーゼKを1μl加えて37℃で10分間インキュベートして反応を終了させた(この組換反応でpFBIF-SFT-1が精製される)。pFBIFはpFastBac1にIgκシグナル配列(配列番号12)及びFLAGペプチド(配列番号13)を挿入したもので、OT3(配列番号14)を鋳型とし、プライマーOT20(配列番号15)とOT21(配列番号16)によって得られたDNA断片を上記と同様にBamHIとEcoRI部位に挿入し、Gateway配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロジェン社製)を用いてConversion cassetteを挿入した。Igκシグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAGタグは生成を容易とするために挿入した。

【 0 0 4 7 】

その後上記反応液5μlをコンピテントセル(大腸菌DH5α)50μlと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含むLBプレートにまいた。翌日コロニーをとり、アンピシリンを含むLB培地5mlで培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製) によりプラスミド(pFBIF-SFT-1)を抽出精製した。得られたプラスミドの一部を使って常法により塩基配列を測定し、目的とするDNAが組み込まれていることを確認した。

【0048】

(3) Bac-to-BacシステムによるBacmidの作成

続いてBac-to-Bacシステム（インビトロジェン社製）を用いて上記pFBIF-SFT-1とpFastBacとの間で組換えを行い、昆虫細胞中で増殖可能なBacmidにSFT-1の配列を挿入した。このシステムはTn7の組換え部位を利用して、Bacmidを含む大腸菌（*E. coli* DH10BAC）に目的遺伝子を挿入させたpFastBacを導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生される組換えタンパク質によって目的とする遺伝子がBacmidへ取り込まれるシステムである。またBacmidにはlacZ遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

【0049】

すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-SFT-1）をコンピテントセル（大腸菌DH10BAC）50 μ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-ブロモインドリル β -D-ガラクトピラノシド（Blue-gal）、及びイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含むLBプレートにまき翌日白い単独コロニーをさらに培養し、Bacmidを回収した。

【0050】

3. Bacmidの昆虫細胞への導入とSFT-1の回収

上記白いコロニーから得られたBacmidを昆虫細胞Sf21（インビトロジェン社製）に導入した。すなわち35mmのシャーレにSf21細胞が 9×10^5 個/2mlの抗生物質を含むSf-900IISFM（インビトロジェン社製）となるように添加し、27℃で1時間培養して細胞を接着させた。溶液Aとして精製したBacmid DNA 5 μ lに抗生物質を含まないSf-900IISFMを100 μ l加えた。溶液BとしてCellFECTIN溶液（インビトロジェン社製）6 μ lに抗生物質を含まないSf-900IISFM 100 μ lを加えた。その後、溶液A及び溶液Bを丁寧に混合して15～45分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まないSf-900IISFMを2ml添加した。溶液Aと溶液Bとを混合して作成した溶液（lipid-DNA complexes）に抗生物質を含まないSf900IISFM 800 μ lを加えて丁寧に混和した。細胞から

培養液を吸引し、希釈したlipid-DNA complexes溶液を細胞に加え、27℃で5時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含むSf-900IISFM培養液2mlを加えて72時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを1,200×gで10分間遠心処理し、上清を別のチューブに保存した（これを一次ウイルス液とした）。

【0051】

T75培養フラスコにSf21細胞 6×10^6 個/15ml Sf-900IISFM（インビトロジェン社製）（抗生物質を含む）を入れ、一次ウイルス液を1ml添加し、27℃で96時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを1,200×gで10分間遠心処理し、上清をチューブに保存した（これを二次ウイルス液とした）。

【0052】

さらに、T75培養フラスコにSf21細胞 6×10^6 個/15ml Sf-900IISFM（インビトロジェン社製）（抗生物質を含む）を入れ、二次ウイルス液を1ml添加し、27℃で72時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを1,200×gで10分間遠心処理し、上清をチューブに保存した（これを三次ウイルス液とした）。

【0053】

加えて、100ml用スピナーフラスコにSf21細胞 6×10^5 個/ml濃度で100mlを入れ、三次ウイルス液を1ml添加して27℃で約96時間培養した。培養後に、細胞及び培養液を回収した。これを1,200×gで10分間遠心処理し、上清を回収した。

【0054】

この培養上清10mlにアジ化ナトリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カルシウムを加え、終濃度をアジ化ナトリウムを0.05%、塩化ナトリウムを150mM、塩化カルシウムを2mMとした。抗FLAG抗体ゲル（Anti-Flag M1 monoclonal antibody Agarose Affinity Gel, SIGMA社製）50 μ lを加えて12時間静かに攪拌した。遠心分離（1,000×g、3分、4℃）して上清を除去した後、1mMの塩化カルシウムを含むトリス緩衝生理的食塩水（TBS）で3回洗浄した。これを遠心分離（1,000×g、3分、4℃）して余分な洗浄液を除きSFT-1-FLAG融合タンパク質を得、活性測定用の

サンプルとした。

【0055】

4. SFT-1-FLAGの確認と酵素活性の測定

(1) SFT-1の確認

上記で精製した融合タンパク質 (SFT-1-FLAG) を結合したゲル $5\mu\text{l}$ を使い、ペルオキシダーゼ標識抗FLAG抗体 (Anti-FLAG M2 Peroxydase, SIGMA社製) を用いて常法に従ってウエスタンブロッティングをおこなった (図1)。その結果、培養上清中に発現しているFLAGタンパク質と新規硫酸基転移酵素との融合タンパク質が回収精製されていることが確認された。

【0056】

(2) ヘパラン硫酸およびヘパリンへの硫酸転移活性測定

$75\mu\text{g/ml}$ のプロタミン塩酸を含む 50mM のイミダゾール塩酸緩衝液 ($\text{pH}6.8$) に、培養上清から精製した融合タンパク質 (SFT-1-FLAG) を添加し、硫酸供与体として $[^{35}\text{S}]\text{-PAPS}$ ($5\times 10^5\text{ cpm}$, NEN社製)、硫酸受容体としてヘパラン硫酸 (ウシ腎臓由来: 生化学工業株式会社製) 及びヘパリン (ブタ腸由来: SIGMA社製) (ヘキソサミン量に換算して $500\mu\text{M}$) を添加して、全量を $50\mu\text{l}$ となるように蒸留水で調整した。この反応液を 37°C で20分反応させ、その後、 100°C で3分加熱して酵素を失活させて反応を停止した。 1.3% 酢酸カリウムと 0.5mM EDTAを含むエタノールを $130\mu\text{l}$ 加えて攪拌した後、遠心分離して得られた沈殿を蒸留水 $50\mu\text{l}$ に溶解した。再度エタノール沈殿を行い、水 $50\mu\text{l}$ に溶解した後、ポアサイズ $0.22\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、HPLCで分離した。カラムはG2500PW (東ソー株式会社製) を使用し、移動相は 0.2M の塩化ナトリウム、流速 0.6ml/分 、カラム温度 35°C で分離を行った。カラムからの溶出液を 0.3ml 毎の画分として回収し、各画分の放射能をシンチレーションカウンターにより計数した (図2)。その結果、溶出時間約12分の位置に放射能のピークが検出された。この溶出時間は硫酸受容体であるヘパラン硫酸またはヘパリンの溶出時間と一致することから、これら2種類の受容体に対して硫酸基を転移する活性を示すことが確認された。

【0057】

また、コンドロイチン硫酸D（サメ軟骨由来：生化学工業株式会社製）、コンドロイチン（牛気管由来コンドロイチン硫酸をJ. Am. Chem. Soc. 79, 152-153(1957)記載の方法に従って完全脱硫酸化して調製した）、デルマタン硫酸（ブタ皮由来：生化学工業株式会社製）、及び脱硫酸化デルマタン硫酸（ニワトリ鶏冠由来デルマタン硫酸をJ. Am. Chem. Soc. 79, 152-153(1957)記載の方法に従って完全脱硫酸化して調製した）を硫酸受容体とし、上記活性測定法と同じ条件で硫酸転移活性を測定した結果、これら受容体に対して硫酸基転移酵素活性は観察されなかった（図3）。したがってSFT-1はヘパラン硫酸およびヘパリンに対して特異的活性を持つことが示唆された。

【0058】

【発明の効果】

本発明により、ヘパラン硫酸に硫酸基を選択的に転移する新規なヘパラン硫酸硫酸基転移酵素（SFT-1）のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAが得られる。また更に該DNA由来のDNA断片から発現されるポリペプチドが得られる。

【0059】

本発明により、SFT-1のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAが得られたので、SFT-1を工業的に使用可能な程度まで大量生産できることが期待される。

【配列表】

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
SEIKAGAKU CORPORATION

<120> Novel heparan sulfate sulfotransferase and nucleic acid
encoding the same

<130> J200200400

<140>

<141>

<160> 16

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1041)

<400> 1

atg cta ttc aaa cag cag gcg tgg ctg aga cag aag ctc ctg gtg ctg 48

Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

gga agc ctt gcc gtt ggg agt ctc ctg tat cta gtc gcc aga gtt ggg 96

Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly

20 25 30

agc ttg gat agg cta caa ccc att tgc ccc att gaa ggt cga ctg ggt 144

Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly

35 40 45

gga gcc cgc act cag gct gaa ttc cca ctt cgc gcc ctg cag ttt aag 192

Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys
 50 55 60

cgt ggc ctg ctg cac gag ttc cgg aag ggc aac gct tcc aag gag cag 240
 Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln
 65 70 75 80

gtt cgc ctc cat gac ctg gtc cag cag ctc ccc aag gcc att atc att 288
 Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile
 85 90 95

ggg gtg agg aaa gga ggc aca agg gcc ctg ctt gaa atg ctg aac cta 336
 Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Asn Leu
 100 105 110

cat ccg gca gta gtc aaa gcc tct caa gaa atc cac ttt ttt gat aat 384
 His Pro Ala Val Val Lys Ala Ser Gln Glu Ile His Phe Phe Asp Asn
 115 120 125

gat gag aat tat ggt aag ggc att gag tgg tat agg aaa aag atg cct 432
 Asp Glu Asn Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Lys Met Pro
 130 135 140

ttt tcc tac cct cag caa atc aca att gaa aag agc cca gca tat ttt 480
 Phe Ser Tyr Pro Gln Gln Ile Thr Ile Glu Lys Ser Pro Ala Tyr Phe
 145 150 155 160

atc aca gag gag gtt cca gaa agg att tac aaa atg aac tca tcc atc 528
 Ile Thr Glu Glu Val Pro Glu Arg Ile Tyr Lys Met Asn Ser Ser Ile

165

170

175

aag ttg ttg atc att gtc agg gag cca acc aca aga gct att tct gat 576

Lys Leu Leu Ile Ile Val Arg Glu Pro Thr Thr Arg Ala Ile Ser Asp

180

185

190

tat act cag gtg cta gag ggg aag gag agg aag aac aaa act tat tac 624

Tyr Thr Gln Val Leu Glu Gly Lys Glu Arg Lys Asn Lys Thr Tyr Tyr

195

200

205

aag ttt gag aag ctg gcc ata gac cct aat aca tgc gaa gtg aac aca 672

Lys Phe Glu Lys Leu Ala Ile Asp Pro Asn Thr Cys Glu Val Asn Thr

210

215

220

aaa tac aaa gca gta aga acc agc atc tac acc aaa cat ctg gaa agg 720

Lys Tyr Lys Ala Val Arg Thr Ser Ile Tyr Thr Lys His Leu Glu Arg

225

230

235

240

tgg ttg aaa tac ttt cca att gag caa ttt cat gtc gtc gat gga gat 768

Trp Leu Lys Tyr Phe Pro Ile Glu Gln Phe His Val Val Asp Gly Asp

245

250

255

cgc ctc atc acg gaa cct ctg cca gaa ctt cag ctc gtg gag aag ttc 816

Arg Leu Ile Thr Glu Pro Leu Pro Glu Leu Gln Leu Val Glu Lys Phe

260

265

270

cta aat ctg cct cca agg ata agt caa tac aat tta tac ttc aat gct 864

Leu Asn Leu Pro Pro Arg Ile Ser Gln Tyr Asn Leu Tyr Phe Asn Ala

275

280

285

acc aga ggg ttt tac tgc ttg cgg ttt aat att atc ttt aat aag tgc 912

Thr Arg Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Phe Asn Ile Ile Phe Asn Lys Cys

290

295

300

ctg gcg ggc agc aag ggg cgc att cat cca gag gtg gac ccc tct gtc 960

Leu Ala Gly Ser Lys Gly Arg Ile His Pro Glu Val Asp Pro Ser Val

305

310

315

320

att act aaa ttg cgc aaa ttc ttt cat cct ttt aat caa aaa ttt tac 1008

Ile Thr Lys Leu Arg Lys Phe Phe His Pro Phe Asn Gln Lys Phe Tyr

325

330

335

cag atc act ggg agg aca ttg aac tgg ccc taa

1041

Gln Ile Thr Gly Arg Thr Leu Asn Trp Pro

340

345

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Phe Lys Gln Gln Ala Trp Leu Arg Gln Lys Leu Leu Val Leu

1

5

10

15

Gly Ser Leu Ala Val Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ala Arg Val Gly

20

25

30

Ser Leu Asp Arg Leu Gln Pro Ile Cys Pro Ile Glu Gly Arg Leu Gly

35	40	45
Gly Ala Arg Thr Gln Ala Glu Phe Pro Leu Arg Ala Leu Gln Phe Lys		
50	55	60
Arg Gly Leu Leu His Glu Phe Arg Lys Gly Asn Ala Ser Lys Glu Gln		
65	70	75
Val Arg Leu His Asp Leu Val Gln Gln Leu Pro Lys Ala Ile Ile Ile		
85	90	95
Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Asn Leu		
100	105	110
His Pro Ala Val Val Lys Ala Ser Gln Glu Ile His Phe Phe Asp Asn		
115	120	125
Asp Glu Asn Tyr Gly Lys Gly Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Lys Met Pro		
130	135	140
Phe Ser Tyr Pro Gln Gln Ile Thr Ile Glu Lys Ser Pro Ala Tyr Phe		
145	150	155
Ile Thr Glu Glu Val Pro Glu Arg Ile Tyr Lys Met Asn Ser Ser Ile		
165	170	175
Lys Leu Leu Ile Ile Val Arg Glu Pro Thr Thr Arg Ala Ile Ser Asp		
180	185	190
Tyr Thr Gln Val Leu Glu Gly Lys Glu Arg Lys Asn Lys Thr Tyr Tyr		
195	200	205
Lys Phe Glu Lys Leu Ala Ile Asp Pro Asn Thr Cys Glu Val Asn Thr		
210	215	220
Lys Tyr Lys Ala Val Arg Thr Ser Ile Tyr Thr Lys His Leu Glu Arg		
225	230	235
Trp Leu Lys Tyr Phe Pro Ile Glu Gln Phe His Val Val Asp Gly Asp		
245	250	255
Arg Leu Ile Thr Glu Pro Leu Pro Glu Leu Gln Leu Val Glu Lys Phe		
260	265	270

Leu Asn Leu Pro Pro Arg Ile Ser Gln Tyr Asn Leu Tyr Phe Asn Ala

275

280

285

Thr Arg Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Phe Asn Ile Ile Phe Asn Lys Cys

290

295

300

Leu Ala Gly Ser Lys Gly Arg Ile His Pro Glu Val Asp Pro Ser Val

305

310

315

320

Ile Thr Lys Leu Arg Lys Phe Phe His Pro Phe Asn Gln Lys Phe Tyr

325

330

335

Gln Ile Thr Gly Arg Thr Leu Asn Trp Pro

340

345

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for
PCR

<400> 3

ctacaacc ca tt

12

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' Primer for
PCR

<400> 4

ttagggccag tt

12

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for
PCR

<400> 5

atgctattca aa

12

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' Primer for

PCR (GP-226)

<400> 6

cggaactcgt gcagcaggcc acgc

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
PCR (GP-224)

<400> 7

tcgaccttca atggggcaaa tggg

24

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
PCR (SFTex2F)

<400> 8

actggggaac cagaaaaatg aaaag

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
PCR (SFTex2R)

<400> 9

gtgtctccag gcacaacaca tagtg

25

<210> 10

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
PCR (SFTgateF2)

<400> 10

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt ctttaagcgt ggcctgctgc acgag

55

<210> 11

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
PCR (SFTgateTstop)

<400> 11

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tagggccagt tcaatgtcct ccc 53

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Ig kappa
signal sequence

<400> 12

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1

5

10

15

Val Ile Met Ser Arg Gly

20

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FLAG peptide

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 14

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT3 seuqnce

<400> 14

gatcatgcat tttcaagtgc agattttcag cttcctgcta atcagtcct cagtcataat 60

gtcacgtgga gattacaagg acgacgatga caag

94

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT20 sequence

<400> 15

cgggatccat gcattttcaa gtgcag

26

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: OT21 sequence

<400> 16

ggaattcttg tcacgctcgt ccttg

25

【 0 0 6 0 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 精製したSFT-1-FLAGをウエスタンブロッティングにより解析した図である。

【図 2】 ヘパラン硫酸及びヘパリンに対する硫酸基転移活性を示す図である。丸はヘパラン硫酸に対する硫酸基転移活性を示し、四角はヘパリンに対する硫酸基転移活性を示す。

【図 3】 コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン、デルマタン硫酸、及びデ

ルマタンへの硫酸基転移活性を示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸D、黒四角はコンドロイチン、黒丸はデルマタン硫酸を、白四角はデルマタンに対する硫酸基転移活性を示す。

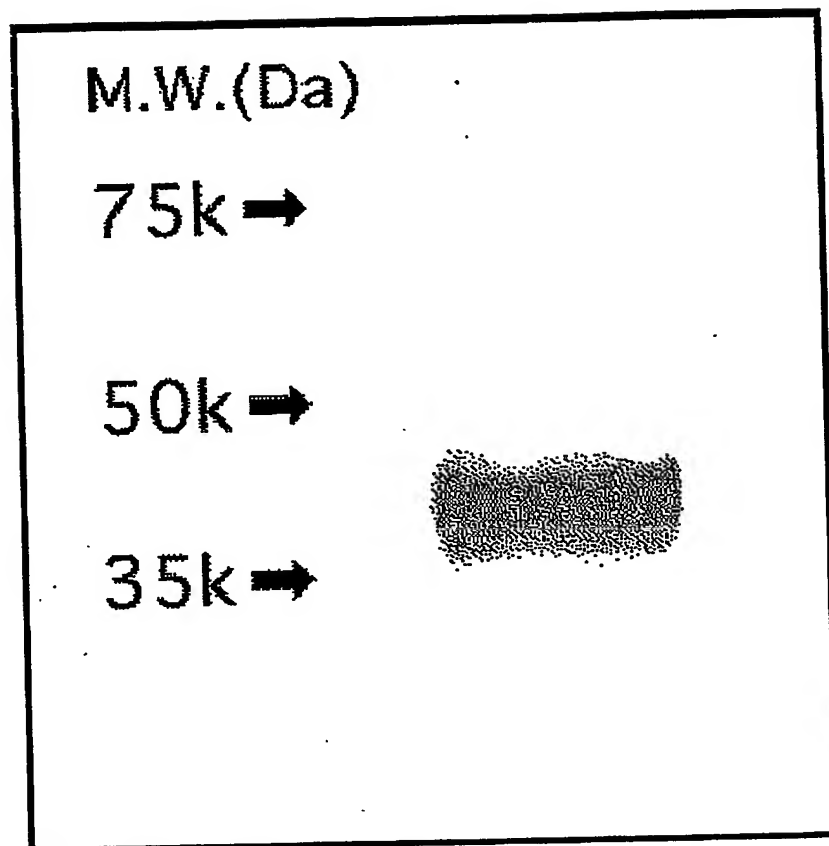
【書類名】

図面

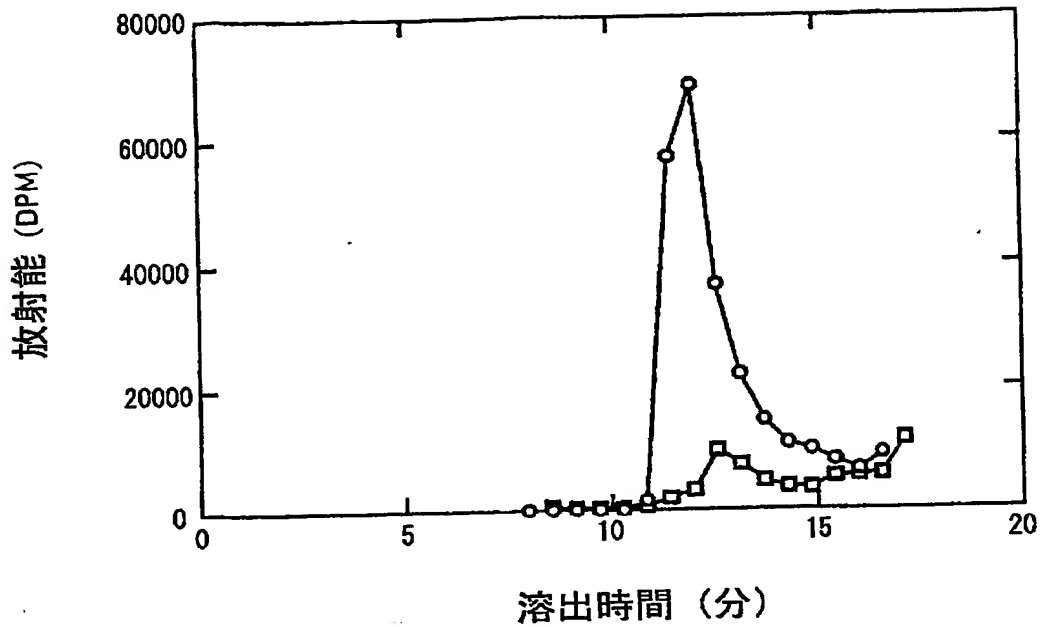
【整理番号】

J200200400

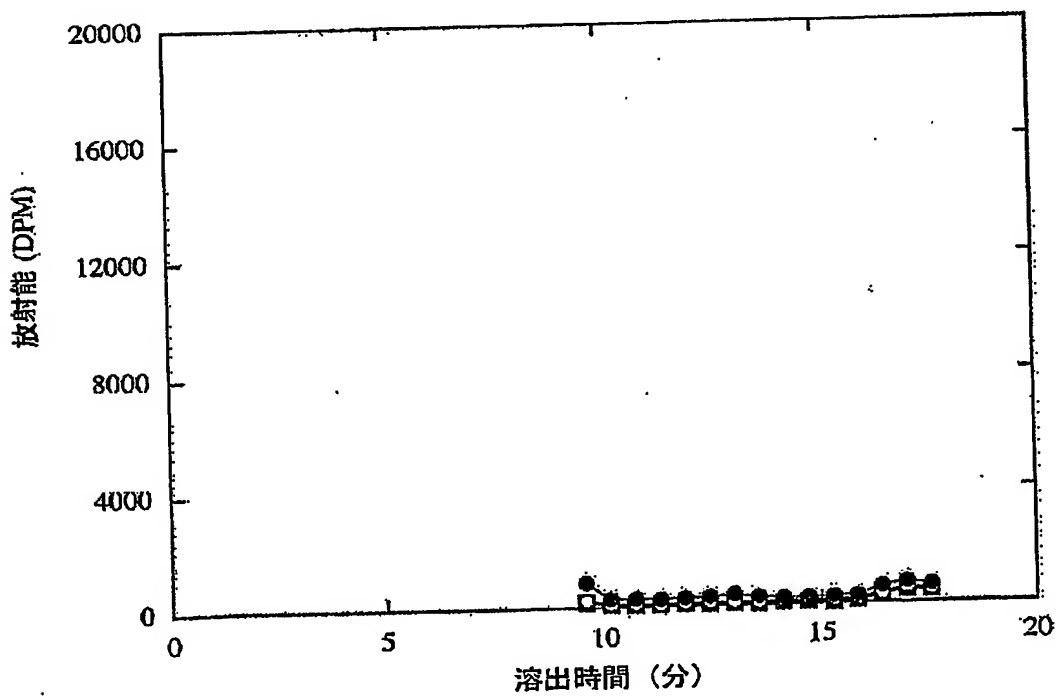
【図1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【整理番号】 J200200400

【要約】

【課題】 新規な硫酸基転移酵素、そのポリペプチド及びそれをコードするDNAを提供する。

【解決手段】 配列番号2記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号37～346からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドを有するとともに、硫酸基供与体から硫酸基受容体であるグリコサミノグリカンに対して硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素、そのポリペプチド、及びそれをコードするDNA。

【選択図】 なし

2002-057527

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2002-057527

受付番号

50200297385

書類名

特許願

担当官

笹川 友子

9482

作成日

平成14年 4月12日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 3月 4日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000195524]

1. 変更年月日

1990年 8月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

氏 名

生化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.